

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月31日 (31.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/38507 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/90, 15/61, C12P 19/02, C12N 1/19 // (C12N 1/19, C12R 1:865) (NAKAYAMA, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒305-0045 茨城県つくば市梅園二丁目32-7-201 Ibaraki (JP). 地神芳文 (JIGAMI, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒300-1233 茨城県牛久市栄町6-255 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/02049
- (22) 国際出願日: 2000年3月30日 (30.03.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平 11/329045 1999年11月19日 (19.11.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 仲山賢一
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ARABIDOPSIS-ORIGIN GDP-4-KETO-6-DEOXY-D-MANNOSE-3,5-EPIMERASE-4-REDUCTASE GENE

(54) 発明の名称: シロイヌナズナ由来のGDP-4-ケート-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子

(57) Abstract: A gene of an enzyme participating in the synthesis of GDP-L-fucose. More particularly speaking, *Arabidopsis*-origin GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase gene and a process for producing GDP-L-fucose by using this enzyme. The enzyme encoded by this gene is: (a) a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; or (b) a protein containing an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 by deletion, substitution, addition or insertion of one or more amino acid residues and having a GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase activity. Thus, GDP-L-fucose, which is essentially required in adding fucose having very important functions to sugar chains, can be efficiently produced in a large amount.

[続葉有]

WO 01/38507 A1



(57) 要約:

本発明は、GDP-L-フコース合成に関与する酵素の遺伝子に関し、より詳細には、シロイヌナズナ由来の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子、及び該遺伝子を利用する GDP-L-フコースの製造方法に関する。該遺伝子によりコードされる酵素は、(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質、又は (b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質である。本発明により、糖鎖において非常に重要な機能をもつフコースの付加を行うために必須である GDP-L-フコースを、多量に効率よく生産することができる。

明 細 書

シロイヌナズナ由来の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-
エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子

5

技術分野

本発明は、GDP-L-フコース合成に関与する酵素の遺伝子に関し、より詳細には、シロイヌナズナ由来の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子、及び該遺伝子を利用する GDP-L-フコースの製造方法に関する。

10

背景技術

糖タンパク質などの糖鎖は、生体において非常に重要な働きをしていることが明らかとなっており、このことから、糖鎖の構造を自在に変換するための糖鎖工学が重要な技術分野となってきた。現在糖鎖を改変する技術としては、化学合成により目的の糖鎖を合成したものをタンパク質に結合させる化学的手法、細胞内の糖鎖合成遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変する、あるいは糖タンパク質を生産する宿主を変えて生産する生物学的手法、糖鎖合成酵素を用いる糖鎖合成法などがある。

15

化学的手法では、大量合成の手法に道が開けてきてはいるが、糖鎖の複雑性から、いまだに全ての種類の糖鎖を簡単に供給するには至っていない。一方、生物学的手法では、遺伝子工学の発展により、糖鎖合成関連遺伝子の発現を制御することが可能となったため、糖鎖の改変は可能となってきたが、全ての糖鎖について均一に合成することは困難であり、常に種類の異なった糖鎖が混在しているのが現状である。

20

これに対して、糖鎖合成酵素を用いた生体外での糖鎖合成は、均一な構造の糖鎖合成には非常に有用であり、特に生物学的手法と組み合わせると、均一で、大量の糖鎖の生産が可能となる。

25

しかしながら、この生体外での糖鎖合成では、糖ヌクレオチドが糖転移酵素の糖供与体として必須であるところ、この糖ヌクレオチドは非常に高価であるので、

この方法を大量生産に用いることは困難となっている。糖ヌクレオチドは、生体内に微量でしか存在せず、かつ、高エネルギー結合で結ばれた非常に反応性に富む不安定な物質であるので、各生物におけるその産生量があまり多くなく、大量に生産することが困難であるのが原因である。

- 5 近年、バクテリアを用いた生産系により、比較的多種類の糖ヌクレオチドの大量生産系が実用的なものへ近づいてきており、その供給は安定する方向へ向かっている。しかしながら、このバクテリアを用いる系では、2種の微生物を混合して、なおかつ、細胞中に含まれる一方の原料を他方の細胞中に送り込むために細胞を破壊した状況で生産を行うことから、ある程度反応過程の長いものでは生産
- 10 量はそれほど多くなく、新たな手法の開発が求められている。

糖ヌクレオチドのうち、GDP-L-フコースはフコース転移酵素の糖供与体としてフコースを含んだ糖鎖合成を行う際には必須のものである。このフコース残基の付加した糖鎖は機能的に重要な役割を果たすことが多く、糖供与体の大量で安価な供給が望まれている。この GDP-L-フコースは GDP-D-マンノースから3段階の反

15 応を経て合成され、これらの3つの反応が2種類の酵素によって触媒されることが報告されている(図1)(Tonetti ら、J. Biol. Chem., Vol.271, 27274 (1996))。これらの酵素は、原核生物である大腸菌などから真核生物であるヒトなどの高等哺乳類にいたるまで、フコースを使用するあらゆる生物がもっている普遍的な酵素である。しかし、このような生物は合成した GDP-L-フコースを使用してい

20 くため、細胞内に GDP-L-フコースが蓄積することはない。このため、生物体から GDP-L-フコースを単離する場合、その量は極めて低くかつ高価である。また、その合成に長い行程を必要とするため、上記のバクテリアの系を用いる手法においても十分な量を供給することは、現状では困難である。

この3段階の反応を触媒する酵素は、最初の1段階目の反応である GDP-D-マン

25 ノースから脱水反応を起こして GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノースに変換する反応を触媒する GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼと、その次の異性化及び還元といった2つの反応を行う GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼの2種類である。植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、最初の反応を触媒する GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラ

ターゼの遺伝子として MUR1 が既に単離されている (Bonin ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 2085 (1997))。

しかしながら、その次の反応を触媒する GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子の単離についてはまだ報告されておらず、遺伝子データベースに他の生物種の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼと相同性の高い配列が登録されているのみである。

発明の開示

本発明の目的は、GDP-L-フコースを効率良く合成するための GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、GDP-D-マンノースからの GDP-L-フコース合成において後半 2 段階の反応を触媒する、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼをコードする遺伝子 (AtFX 遺伝子) を単離し、この遺伝子の塩基配列を明らかにするとともに、該遺伝子を、シロイヌナズナの GDP-L-フコース合成において最初の反応を触媒する MUR1 遺伝子とともに共発現させることによって、生体内及び生体外で効率よく GDP-L-フコースが合成されることを見だし、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質を提供する。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

さらに、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA を提供する。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残

基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

前記 DNA は、好ましくは配列番号 2 で表される塩基配列を含む。

- 5 さらに、本発明は、上記 DNA を含む発現ベクターを提供する。

さらに、本発明は、上記発現ベクターによって形質転換された形質転換体を提供する。このような形質転換体としては、例えば、酵母 W303/pY0-AtFX-Myc 株 (FERM BP-7109) が挙げられる。さらに、本発明は、該形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼを採取することを特徴とする GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼの製造方法を提供する。

- さらに、本発明は、上記発現ベクター及び GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼをコードする DNA を含む発現ベクターによって形質転換された形質転換体を提供する。このような形質転換体としては、例えば、酵母 W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株 (FERM BP-7108) が挙げられる。さらに、本発明は、該形質転換体を用いて GDP-D-マンノースを GDP-L-フコースに変換する方法、並びに、該形質転換体を、GDP-D-マンノースと共に培地に培養し、得られる培養物から GDP-L-フコースを採取することを特徴とする GDP-L-フコースの製造方法を提供する。

- 20 本明細書は、本願において主張する優先権の基礎である日本国特許出願第 11-329045 号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

配列表の説明

配列番号 3～6：プライマー

図面の簡単な説明

- 25 図 1 は、GDP-D-マンノースから GDP-L-フコースへの酵素反応過程を示す図である。

図 2 は、ウエスタンブロッティングによる MUR1 及び AtFX タンパク質の発現を示す電気泳動写真である。

図 3 は、HPLC による GDP-L-フコース合成活性の測定結果を示すクロマトグラム

である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、アミノ酸配列及び塩基配列の略号による表示は、IUPAC-IUB 5 Bの規定及び当該分野における通称又は慣行に従うものとする。

1. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子の単離

本発明の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子は、一般的手法に従ってシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 10 から調製した cDNA ライブラリを鋳型とし、PCR 法により単離することができる。

シロイヌナズナの cDNA ライブラリは、通常用いられているプラスミドベクター、λファージ由来のベクター等を用い、当業者に公知の方法に従って作製することができる。また、市販のシロイヌナズナ由来 cDNA ライブラリを用いて 15 もよい。

PCR 法は、生体外において、DNA の特定の領域を、そのセンスプライマー及びアンチセンスプライマー、耐熱性の DNA ポリメラーゼ、DNA 増幅システム等の組み合わせを用いて、約 2～3 時間で 10～100 万倍に特異的に増幅することができる技術である。本発明の DNA は、適切なプライマーを用いることにより、PCR 法での増幅が可能である。 20

上記 PCR において用いることのできるプライマーは、他種の酵素遺伝子との塩基配列の相同性等に基づいて設計することができる。他種の酵素遺伝子の塩基配列としては、GenBank 等の公知の DNA 配列データベースに登録されているものを用いることができ、これらは、当業者であれば容易に検索することができる。 25 このような塩基配列としては、例えば、GenBank アクセッション番号 U38473、U58766、及び AF045286 に登録されているものが挙げられる。さらに、プライマーを設計する際には、PCR 増幅後に行う遺伝子操作を考慮して、プライマーの塩基配列中に制限酵素部位等の配列を含ませることができる。

このようにして設計されるプライマーとしては、以下の塩基配列を有するもの

が挙げられる。

フォワードプライマー：

5'-ATTGGTACCATGTCTGACAAATCTGCCAAATCTTCGTC-3' (配列番号 3)

リバースプライマー：

5 5'-TTAGTCGACGATATCTCGGTTGCAAACATTCTTCAAATACCAATCATAAG-3' (配列番号 4)

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部分は KpnI 部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分は EcoRV 部位を示す。これらのプライマーを用いて PCR を行うことにより、本発明の DNA が良好に増幅することができる。

10 PCR を行うための PCR 溶液には、鋳型として用いる cDNA ライブラリ及びプライマーの他、耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 混合物等を添加する必要がある、このような PCR 溶液は当業者であれば適切に調製することができるが、例えば、以下の表 1 に示すような組成とすることができる。

15

表 1

PCR 溶液の組成	
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μ l
フォワードプライマー (20pmol/ μ l)	1 μ l
リバースプライマー (20pmol/ μ l)	1 μ l
cDNA ライブラリー (1 ng/ μ l)	1 μ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
水	33.5 μ l
合計	50.0 μ l

PCR の条件は、使用するプライマーの塩基配列等に従って、当業者は適切に
20 設定することができるが、例えば、94℃で 15 秒 (変性)、50℃で 30 秒 (アニーリング) 及び 68℃で 2 分 (伸長) の反応を 30 サイクルとするとよい。このような反応は、市販のサーマルサイクラー等を用いて容易に行うことができる。

上記 PCR によって増幅された DNA は、適切なプラスミド中にクローン化す

ることができる。DNAを組み込むプラスミドとしては、宿主内で複製保持されるものであればいずれも使用することができるが、例えば、大腸菌由来の pBR322 や pUC19 などを用いることができる。

また、増幅されたDNAのクローンは、市販のキットを用いて行うこともでき、このようなキットとしては、例えば、TA クローニングキット (Invitrogen) が挙げられる。市販のキットを用いる場合には、プラスミドとしては、該キットに含まれるものを用いることができる。

本発明のDNAを含むプラスミドを大腸菌等に組み込む方法としては、例えば、T. Maniatis らの方法[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1st Edition, p.250 (1982)], F. M. Ausubel らの方法[Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition, 1-27 (1999)]等が挙げられる。

本発明のDNAの塩基配列は、上記のようにして得られるプラスミドを用い、ジデオキシ法等の公知の方法によって決定することができる。このような塩基配列決定は、市販のキットを用いて行うこともでき、このようなキットとしては、例えば、シーケンスキット (PE Biosystems) が挙げられる。さらに、本発明のDNAの塩基配列が決定されると、該塩基配列から、本発明のタンパク質のアミノ酸配列が推定される。

本発明のタンパク質は、配列番号1に表されるアミノ酸配列を含んでおり、該タンパク質は GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有する。さらに、本発明のタンパク質のアミノ酸配列は配列番号1に表されるものに限定されるものではなく、該タンパク質が GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有する限りにおいて、配列番号1において1個又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加、又は挿入されたアミノ酸配列であってもよい。

本発明のDNAは、上記のような本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。このような塩基配列としては、1つのアミノ酸に対して複数のコード配列が存在し得ることを考慮すると、多くの塩基配列が考えられるが、例えば、配列番号2に表される塩基配列が挙げられる。配列番号2に表される塩基配列以外の塩基配列を含む本発明のDNAは、部位特異的変異誘発法 (Zoller

ら、Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 20, 6487-6500 (1982))、化学的合成法等により、当業者であれば容易に調製することができる。

2. 本発明のDNAを発現する発現ベクターの構築

クローン化された本発明のDNAは、発現に適したベクター中のプロモータの
5 下流に連結して発現ベクターを構築することができる。ベクターとしては、酵母由来のプラスミド YEp352GAP、YEp51、pSH19、pY0325 等が挙げられる。

発現用ベクターに組み込むDNAとしては、本発明のDNAであって、その5'末端に翻訳開始コドンであるATGを有し、3'末端に翻訳終止コドンであるTAA、TGA又はTAGを有するものを用いる。また、5'末端又は3'末端に、例えばヘマグル
10 チニンタンパク質の一部分である標識抗原遺伝子やGSTタンパク質等の標識タンパク質遺伝子を結合させて発現させてもよい。

さらに該遺伝子が発現させるためには、その上流にプロモータを接続することが好ましいが、本発明で用いられるプロモータとしては、遺伝子が発現に用いる宿主に対応した適切なプロモータであれば、いかなるものでもよい。例えば、形
15 質転換する宿主が酵母である場合には、プロモータとしては、ENO1プロモータ、GAL10プロモータ、GAPDHプロモータ、ADHプロモータ等が挙げられる。

さらに該遺伝子の転写を終了させるために、その下流にターミネータを接続してもよい。本発明で用いられるターミネータとしては、遺伝子が発現に用いる宿主に対応した適切なターミネータであれば、いかなるものでもよい。例えば、形
20 質転換する宿主が酵母である場合には、ターミネータとしては、ENO1ターミネータ、GAL10ターミネータ、GAPDHターミネータ、ADHターミネータ等が挙げられる。

これらの本発明のDNA、プロモータ、ターミネータ等の発現用ベクターへの組込み操作は、当業者であれば適切に行うことができる。

3. 本発明の発現ベクターを保持する形質転換体の作製

25 上記「2. 本発明のDNAを発現する発現ベクターの構築」の記載に従って構築される本発明の発現ベクターを、適切な宿主に導入することによって、本発明のタンパク質を発現する形質転換体を作製することができる。

宿主としては、GDP-L-フコースを生体内で消費しないものであればいかなるものでも使用することができ、特に制限されないが、好ましくは酵母を使用する。

酵母としては、例えば、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)その他の酵母(*Pichia pastoris* など)等が挙げられる。また、GDP-L-フコースの生産に酵素抽出物を用いる場合、すなわち、生体外で GDP-L-フコースを生産する場合、細胞質内で本発明のタンパク質を発現することが可能な宿主であれば、いかなるものでも用

5 いることができる。

上記形質転換体の作製は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法により行うことができる。例えば、宿主が酵母であれば、リチウム法、エレクトロポレーション法等により、本発明の発現ベクターを導入する。

このようにして得られる形質転換体としては、例えば W303/pY0-AtFX-Myc 株(F

10 ERM BP-7109) を挙げることができる。

さらに、形質転換体の培養により GDP-L-フコースの生産を行うためには、宿主は、あらかじめ GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターで形質転換されているか、あるいは本来 GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現しているものである必要がある。GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼ遺

15 伝子としては、好ましくはシロイヌナズナ由来の MUR1 遺伝子を用いる。

GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターは、本発明のタンパク質を発現する発現ベクターについて上述した方法に従って、構築することができる。ただし、GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼをコードする DNA をクローニングする際の PCR において使用するプライマーは、GDP-D-マンノース-

20 4,6-デヒドラターゼ遺伝子の公知の塩基配列の比較等により設計したものを用いる必要があるが、例えば、以下の塩基配列を有するプライマーを用いることができる。

フォワードプライマー：

5'-GTCGAATTCATGGCGTCAGAGAACAAC-3' (配列番号 5)

25 リバースプライマー：

5'-GAACTCGAGAGGTTGCTGCTTAGCATC-3' (配列番号 6)

上記のような、GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターが導入された形質転換体としては、例えば W303/YEp-MUR1-HA 株(FERM BP-7107) が挙げられる。さらに、このような形質転換体に本発明の発現ベク

ターを導入した形質転換体としては、例えば、W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株 (FERM BP-7108) が挙げられる。

なお、上述の W303/pY0-AtFX-Myc 株、W303/YEp-MUR1-HA 株、及び W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株は、それぞれ FERM BP-7109、FERM BP-7107、及び FERM BP-7108 の受託番号で、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている。

4. 本発明の形質転換体の培養による本発明のタンパク質の生産

本発明の形質転換体、すなわち本発明の発現ベクターを導入したもの（例えば、W303/pY0-AtFX-Myc 株）、又は GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターがさらに導入されている形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株）を適切な培地に培養し、得られる培養物から本発明のタンパク質、すなわち GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼを単離することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法によって行うことができる。大腸菌や酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸類、及び又はエタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

特に、酵母を培養するための培地としては、例えば、YPD 培地、SD 培地等が挙

げられる。

微生物を宿主として得られた形質転換体の培養は、好ましくは、25～37℃で12時間～5日間行い、必要により通気や攪拌を行うことができる。pHは通常用いられる範囲であればよく、特に制限されないが、好ましくは5.0～7.5、より好ましくは約7.5に保持する。pHの調整は、無機酸又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に加えてもよい。プロモータとして誘導性プロモータを有する発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。

10 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清等を添加した培地が用いられる。植物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ及びスクーグ(MS)の培地が用いられる。

15 動物細胞を宿主として得られた形質転換体の培養は、通常、5%CO₂存在下、約37℃で1～2日間行う。培養中は、必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

培養後、本発明のタンパク質を培養物から採取する。該酵素が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎等することにより、該酵素を採取
20 することができる。また、該酵素が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用して、又は遠心分離等により菌体若しくは細胞を除去した後に、該酵素を採取することができる。該酵素の採取は、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等を、単独で又は適宜
25 組み合わせて用いることにより行うことができる。

以上のようにして得られたタンパク質が本発明のタンパク質であることの確認は、一般的な酵素化学反応、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動等の電気泳動法、抗原抗体反応等の免疫学的方法などにより行うことができる。

5. GDP-L-フコースの生産

GDP-L-フコースの生産は、本発明の形質転換体を培養することにより、又は GDP-L-フコース製造に必要な酵素源を用いる酵素反応により行うことができる。

(1) 本発明の形質転換体の培養による GDP-L-フコースの生産

- 5 本発明の発現ベクター及び GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターの双方が導入されている形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株）を、GDP-D-マンノースと共に適切な培地に培養し、得られる培養物から GDP-L-フコースを単離・精製することができる。

形質転換体を培養する際の培地、温度、培養期間、pH その他の条件は、上記「4. 本発明の形質転換体の培養による本発明のタンパク質の生産」に記載したとおり
10 である。また、必要に応じて NADPH 等の補助因子を培地に添加してもよい。

上記培養物からの GDP-L-フコースの抽出は、宿主細胞を遠心分離によって培地と分け、宿主細胞を破碎して、さらに遠心分離することにより行うことができる。宿主が酵母である場合、例えばガラスビーズによって細胞を破壊し、遠心分離によって、GDP-L-フコースを含む上清画分を得ることができる。

- 15 上記の上清画分からの GDP-L-フコースの単離・精製は、当業者であれば容易に行うことができるが、例えば、ゲルろ過法により低分子量の画分を集め、さらに HPLC による分離を行うことにより行うことができる。ここで用いるゲルろ過用ゲル、カラムのサイズ及び溶離液、並びに HPLC 用カラム及び溶離液等は、当業者であれば適切に選択することができる。

20 (2) 酵素源を用いる酵素反応による GDP-L-フコースの生産

GDP-L-フコースの生産は、必要な酵素を含む酵素源を用いる酵素反応によっても行うことができる。

- 酵素反応の基質として GDP-D-マンノースを用いる場合には、必要となる酵素は GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼ及び GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノ
25 ス-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ（本発明のタンパク質）である。これらの酵素は、それぞれを発現する形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA 株及び W303/pY0-AtFX-Myc 株）を培地に培養して別個に発現させ、その後に混合して用いてもよいが、好ましくは、これらの酵素の双方を発現する形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株）を培地に培養して発現させる。形質転換体の

培養物からのこれらの酵素の単離は、上記「4. 本発明の形質転換体の培養による本発明のタンパク質の生産」に記載されている方法により行うことができる。また、上記の酵素反応に用いる酵素源は、精製酵素である必要はなく、上記形質転換体の細胞内抽出液等の粗抽出物であってもよい。

- 5 上記酵素源及び基質となる GDP-D-マンノースを含む反応液を調製し、適切な条件下で酵素反応を行うことができる。該反応液には、必要に応じて、NADPH 等の補助因子を添加してもよい。反応条件は、当業者であれば適切に設定することができるため、特に制限されないが、温度は、好ましくは 30℃～37℃、より好ましくは約 37℃とし、pH は、好ましくは 6.0～8.0、より好ましくは約 7.5 とする。pH を所望の範囲に保持するためには、Tris-HCl 等の緩衝液を用いることができる。

- 15 酵素反応液からの GDP-L-フコースの単離は、当業者であれば容易に行うことができる。例えば、酵素反応液中のタンパク質を熱変性させ、これを遠心分離、メンブレンフィルター等を用いて除去した後に、HPLC により GDP-L-フコースを単離精製することができる。

該 GDP-L-フコースはフコース含有糖鎖の合成の際に糖供与体として必須なものである。機能的に重要と思われる糖鎖へのフコース付加の際に有用なものである。

- 以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

実施例 1

AtFX 遺伝子の単離及び配列決定

- 25 シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の cDNA ライブラリを用いて、PCR 法による AtFX 遺伝子のクローニングを行った。cDNA ライブラリとしては、QUICK-Clone cDNA (CLONTECH 社) を用いた。

プライマーは、データベース上に登録されている塩基配列 (DB 名: GenBank; アクセス番号: U38473、U58766、及び AF045286) に基づいて設計した。その際に、タンパク質をコードしている部分が制限酵素を用いて容易に切り出せるとともに、標識抗原遺伝子等が簡単に挿入できるように、N-末端部分に KpnI 部位、

C-末端部分に EcoRV 部位をあらかじめ含んだプライマーを設計した。それぞれのプライマーの塩基配列を以下に示す。

フォワードプライマー：

5'-ATTGGTACCATGTCTGACAAATCTGCCAAATCTTCGTC-3' (配列番号 3)

5 リバースプライマー：

5'-TTAGTCGACGATATCTCGGTTGCAAACATTCTTCAAATACCAATCATAAG-3' (配列番号 4)

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部分は KpnI 部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分は EcoRV 部位を示す。このようにして設計したプライマーは、常法により合成した。

10 上記 QUICK-Clone cDNA (CLONTECH 社) を鋳型として用い、上記のプライマーを使用して PCR を行った。PCR 溶液の組成は以下の表 2 に示す。

表 2

PCR 溶液の組成	
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μ l
フォワードプライマー (20pmol/ μ l)	1 μ l
リバースプライマー (20pmol/ μ l)	1 μ l
cDNA ライブラリー (1 ng/ μ l)	1 μ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
水	33.5 μ l
合計	50.0 μ l

15

また、PCR の温度条件は、94°C で 15 秒 (変性)、50°C で 30 秒 (アニーリング) 及び 68°C で 2 分 (伸長) の反応を 30 サイクルとした。

この PCR によって得られた約 1 kbp の DNA 増幅断片を、アガロース電気泳動で分離した後、TA クローニングキット (Invitrogen) を用いて pCR2.1 ベクターに挿入した。このクローニングされた DNA の塩基配列を、ダイデオキシ法を用いるシーケンスキット (PE Biosystems) により決定した。この塩基配列を配列番号 2 に、該塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

実施例 2

AtFX 遺伝子発現ベクター及び MUR1 遺伝子発現ベクターの作製、並びにこれらのプラスミドを含む酵母形質転換体の作製

pCR2.1 ベクターに挿入されている AtFX 遺伝子の EcoRV 部位に、標識抗原をコードする 3xMyc 遺伝子 (Evan ら、Mol. Cell Biol., Vol.5, 3610 (1985)) を、AtFX 遺伝子とフレームが合うように挿入した。この Myc 遺伝子を含む AtFX 遺伝子を KpnI-XhoI で切り出し、この断片を、酵母の発現ベクター YEp352GAP (Roy ら、J. Biol. Chem., Vol.273, 2583 (1998)) のマルチクロニング部位を pUC18 のマルチクロニング部位のうちの EcoRI から SalI までの部分でさしかえた発現用ベクター YEp352GAP-II の KpnI-SalI 部位に挿入した。さらにこのベクターから GAPDH プロモータ、AtFX-Myc、GAPDH ターミネータの 3 つの部分を含む断片を BamHI を用いて切り出し、該断片を、LUE2 マーカーを持つ酵母の多コピーベクター pY0325 (Qadota ら、Yeast, Vol.8, 735 (1992)) の BamHI 部位に挿入し、AtFX 遺伝子発現ベクター pY0-AtFX-Myc を構築した。

MUR1 遺伝子もまた、実施例 1 と同様に PCR を用いてクローニングした。ただし、PCR 用プライマーとしては、以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。
フォワードプライマー：

5'-GTCGAATTCATGGCGTCAGAGAACAAC-3' (配列番号 5)

リバースプライマー：

5'-GAACTCGAGAGGTTGCTGCTTAGCATC-3' (配列番号 6)

次いで、MUR1 遺伝子を YEp352GAP ベクター (Roy ら、J. Biol. Chem., Vol.273, 2583 (1998)) の EcoRI 部位に挿入し、さらにインフレームになるように 3xHA 標識抗原遺伝子を PvuII 部位に挿入して MUR1 遺伝子発現ベクター YEp-MUR1-HA を構築した。

これらの発現ベクターは、それぞれ単独で又は 2 つ一緒に酵母の W303-1A 株 (ura3, lue2, his3, trp1, ade2) (Kainuma ら、Glycobiology, Vol.9, 133 (1999)) に形質転換し、pY0-AtFX-Myc のみを含む W303/pY0-AtFX-Myc 株、YEp-MUR1-HA のみを含む W303/YEp-MUR1-HA 株、及び pY0-AtFX-Myc と YEp-MUR1-HA の双方を含む W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株を得た。

実施例 3

MUR1 タンパク質及び AtFX タンパク質の酵母内での発現

実施例 2 で得られた形質転換体について、それぞれの細胞内でタンパク質が発現されるかどうかを、ウエスタンブロッティングを用いて確認した。

- 5 まず、上記形質転換体 (W303/YEp-MUR1-HA 株、W303/pY0-AtFX-Myc 株、及び W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株) 及び W303 株のそれぞれを SD 培地上にて 30℃ で 24 時間培養し、得られた酵母細胞をガラスビーズで破碎した。得られた破碎物を遠心操作 (100,000×g、4℃、60 分間) することにより細胞質画分だけを分離し、75%硫酸アンモニウムでタンパク質画分だけを沈降させた。このタンパク質
- 10 沈殿画分を、0.5mM DTT を含む 20mM Tris-HCl (pH7.5) に溶かし、Sephadex G50 (Pharmacia、0.5mM DTT を含む 20mM Tris-HCl, pH7.5、1.3cm×2.6cm) で脱塩することにより酵素液を得た。該酵素液について、BCA キット (RIERCE) を用いてタンパク質定量を行った。それぞれタンパク質 100µg に相当する酵素液をとって SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に電気的に転写し、それぞれ、HA 抗体若しくは
- 15 Myc 抗体を用いてタンパク質の発現を確認した(図 2)。

その結果、W303/YEp-MUR1-HA 株及び W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株では MUR1 タンパク質が、W303/pY0-AtFX-Myc 株及び W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株では AtFX タンパク質が発現していることが確かめられた。

実施例 4

20 GDP-L-フコース合成活性測定

- GDP-L-フコース合成活性測定は、実施例 3 で調製した各酵素液について、基質として GDP-D-マンノースを、補助因子として 50mM NADPH を用いて行った。まず、50mM NADPH を含有する緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM EDTA) 50µl に GDP-D-マンノース 50nmol を添加し、これにタンパク質 700µg に相当する各酵
- 25 素液を加えて、37℃で 1 時間インキュベートした。次いで、この反応液を 100℃で 3 分間沸騰させた後、沈殿した変性タンパク質を、10,000rpm で 5 分間遠心して取り除き、上清をウルトラフリー (0.20µm) で分子量 10,000 以上のものを取り除き、HPLC により GDP-L-フコースと GDP-D-マンノースの測定を行った。HPLC は C18 カラム (wakosil 5C18-200、和光純薬工業、直径 0.46cm×長さ 25cm)

を用いて 0.5M KH_2PO_4 水溶液を 1ml/min で流して分離を行った。

その結果、MUR1 タンパク質と AtFX タンパク質を共発現させた W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc 株のみで GDP-L-フコース合成活性を検出した(図3)。MUR1 タンパク質のみではなんの活性も示さず、酵母で単独発現させた場合、活性が保たれていないことが分かった。このことは、GDP-L-フコースを合成する場合、AtFX タンパク質は、MUR1 タンパク質による第1段階の反応の後に GDP-L-フコースを完成させるだけではなく、MUR1 タンパク質の活性型を安定化する作用もあることが明らかとなった。

10 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体を本明細書に組み入れるものとする。

産業上の利用の可能性

15 本発明により、糖鎖において非常に重要な機能をもつフコースの付加を行うために必須である GDP-L-フコースを、多量に効率よく生産することができる。現時点において糖タンパク質糖鎖を均一に合成する技術は確立されておらず、最終的には生体外での糖鎖の修飾を行うことで糖鎖の均一な合成を行うことが考えられるが、この際、糖供与体として糖ヌクレオチドは必須なものである。特に、フコースにおいては GDP-L-フコースが大変高価なため、生体外での修飾反応を大量に行うことは非現実的であるが、本発明により多量の GDP-L-フコースの供給が可能となれば、フコースの付加した高機能な糖鎖の合成を生体外で行うことができる。

請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質。
 - (a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。
 - 5 (b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。
2. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA。
 - 10 (a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。
 - (b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。
- 15 3. 配列番号 2 で表される塩基配列を含む、請求項 2 記載の DNA。
4. 請求項 2 又は 3 に記載の DNA を含む発現ベクター。
5. 請求項 4 記載の発現ベクターによって形質転換された形質転換体。
6. 請求項 5 記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼを採取すること
- 20 を特徴とする GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼの製造方法。
7. 請求項 4 記載の発現ベクター及び GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼをコードする DNA を含む発現ベクターによって形質転換された形質転換体。
8. 請求項 7 記載の形質転換体を用いて GDP-D-マンノースを GDP-L-フコースに変換する方法。
- 25 9. 請求項 7 記載の形質転換体を、GDP-D-マンノースと共に培地に培養し、得られる培養物から GDP-L-フコースを採取することを特徴とする GDP-L-フコースの製造方法。

图 1

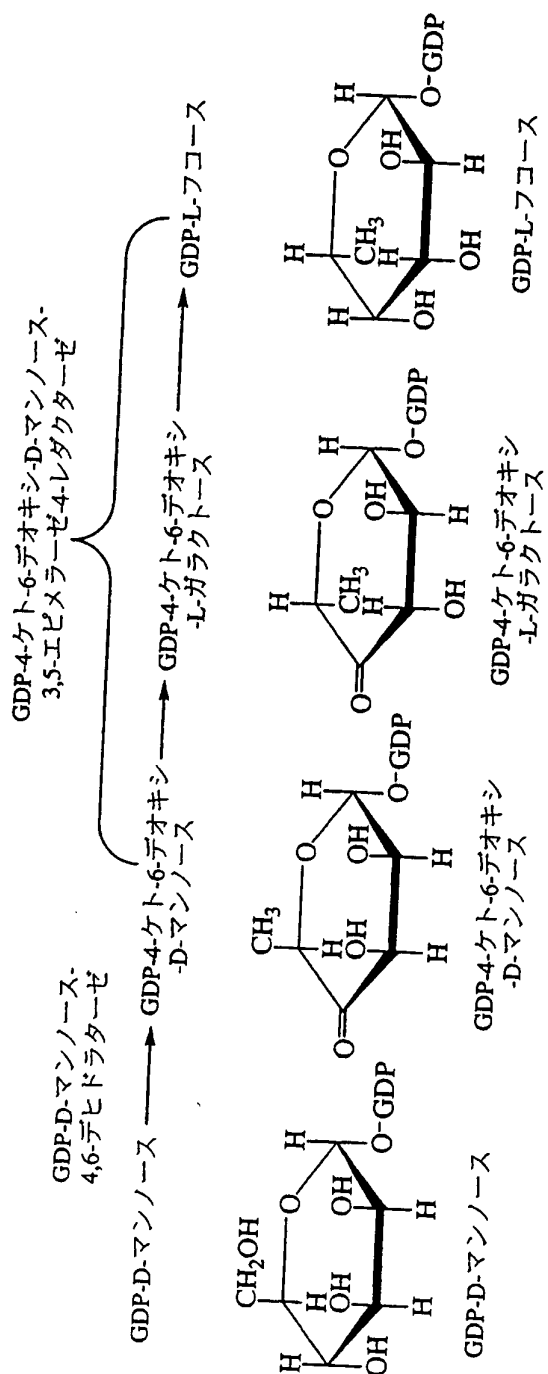
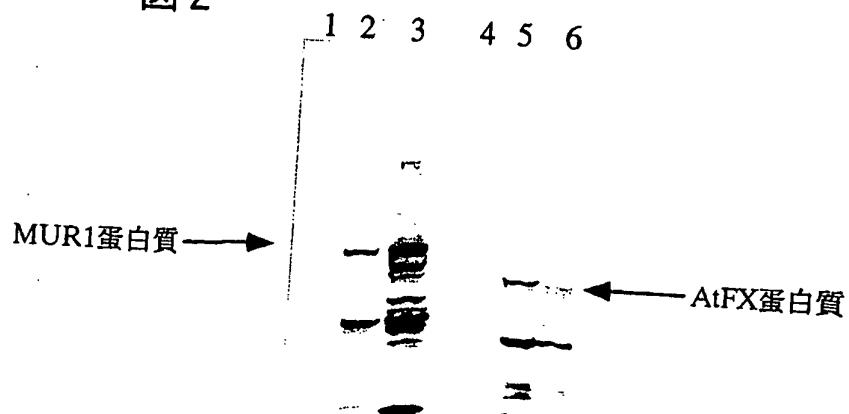
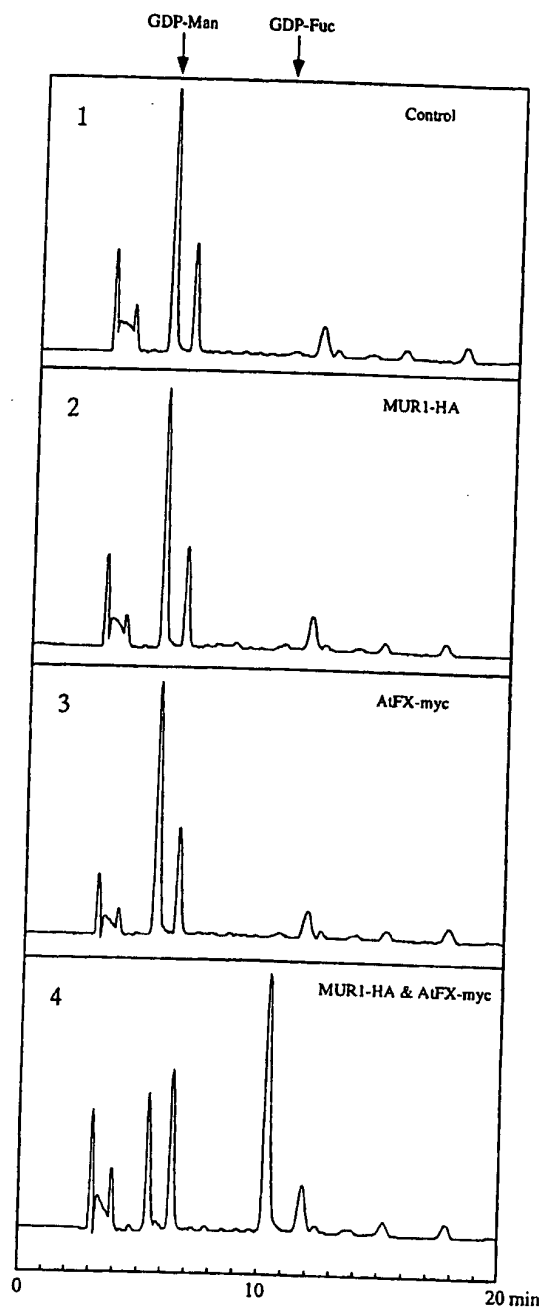


図 2



1, 4; W303株
 2; MUR1単独発現株
 5; AtFX単独発現株
 3, 6; MUR1およびAtFX共発現株

図 3



- 1; W303株
2; MUR1単独発現株
3; AtFX単独発現株
4; MUR1およびAtFX共発現株

SEQUENCE LISTING

<110> Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> A GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase
Gene From Arabidopsis Thaliana and Method for Producing
A GDP-fucose Using Thereof

<130> PH-935-PCT

<150> JP 11-329045

<151> 1999-11-19

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 312

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ser Asp Lys Ser Ala Lys Ile Phe Val Ala Gly His Arg Gly Leu
1 5 10 15

Val Gly Ser Ala Ile Val Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gly Phe Thr Asn
20 25 30

Leu Val Leu Lys Thr His Ala Glu Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala Asp
35 40 45

Val Glu Ser Phe Phe Ser Gln Glu Lys Pro Val Tyr Val Ile Leu Ala
50 55 60

Ala Ala Lys Val Gly Gly Ile His Ala Asn Asn Thr Tyr Pro Ala Asp
65 70 75 80

Phe Ile Gly Val Asn Leu Gln Ile Gln Thr Asn Val Ile His Ser Ala
85 90 95

Tyr Glu His Gly Val Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Ser Cys Ile
100 105 110

Tyr Pro Lys Phe Ala Pro Gln Pro Ile Pro Glu Ser Ala Leu Leu Thr
115 120 125

Ala Ser Leu Glu Pro Thr Asn Glu Trp Tyr Ala Ile Ala Lys Ile Ala
130 135 140

Gly Ile Lys Thr Cys Gln Ala Tyr Arg Ile Gln His Gly Trp Asp Ala
145 150 155 160

Ile Ser Gly Met Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Pro Asn Asp Asn Phe His
165 170 175

Pro Glu Asn Ser His Val Leu Pro Ala Leu Met Arg Arg Phe His Glu
180 185 190

Ala Lys Val Asn Gly Ala Glu Glu Val Val Val Trp Gly Thr Gly Ser

195

200

205

Pro Leu Arg Glu Phe Leu His Val Asp Asp Leu Ala Asp Ala Cys Val

210

215

220

Phe Leu Leu Asp Arg Tyr Ser Gly Leu Glu His Val Asn Ile Gly Ser

225

230

235

240

Gly Gln Glu Val Thr Ile Arg Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Glu Val

245

250

255

Val Gly Phe Glu Gly Lys Leu Gly Trp Asp Cys Thr Lys Pro Asp Gly

260

265

270

Thr Pro Arg Lys Leu Met Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Leu Gly Trp

275

280

285

Thr Pro Lys Val Ser Leu Arg Asp Gly Leu Ser Gln Thr Tyr Asp Trp

290

295

300

Tyr Leu Lys Asn Val Cys Asn Arg

305

310

<210> 2

<211> 936

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(936)

<400> 2

atg tct gac aaa tct gcc aaa atc ttc gtc gcg ggt cat cgt ggt ttg 48
 Met Ser Asp Lys Ser Ala Lys Ile Phe Val Ala Gly His Arg Gly Leu
 1 5 10 15

gtt gga tct gcc att gtc cgc aag ctt cag gaa caa ggt ttc acc aat 96
 Val Gly Ser Ala Ile Val Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gly Phe Thr Asn
 20 25 30

ctc gtt ctt aaa aca cac gcc gag ctt gat ctc act cgt caa gcc gat 144
 Leu Val Leu Lys Thr His Ala Glu Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala Asp
 35 40 45

gtt gaa tcc ttc ttt tct caa gag aag cca gtt tat gta atc cta gca 192
 Val Glu Ser Phe Phe Ser Gln Glu Lys Pro Val Tyr Val Ile Leu Ala
 50 55 60

gca gct aaa gtt ggt ggt att cac gct aac aac acc tat cct gct gat 240
 Ala Ala Lys Val Gly Gly Ile His Ala Asn Asn Thr Tyr Pro Ala Asp
 65 70 75 80

ttc att ggt gtc aat ctc cag att cag acc aat gtg atc cac tct gca 288
 Phe Ile Gly Val Asn Leu Gln Ile Gln Thr Asn Val Ile His Ser Ala

85

90

95

tat gag cac ggt gtg aag aag ctt ctc ttc ctt gga tca tcc tgc att 336
 Tyr Glu His Gly Val Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Ser Cys Ile
 100 105 110

tac cct aaa ttt gct cct cag cca att cct gag tct gct ttg tta aca 384
 Tyr Pro Lys Phe Ala Pro Gln Pro Ile Pro Glu Ser Ala Leu Leu Thr
 115 120 125

gca tcg ctt gaa cca act aat gag tgg tat gct att gct aag atc gct 432
 Ala Ser Leu Glu Pro Thr Asn Glu Trp Tyr Ala Ile Ala Lys Ile Ala
 130 135 140

ggg att aag act tgt cag gct tat agg att cag cac gga tgg gat gca 480
 Gly Ile Lys Thr Cys Gln Ala Tyr Arg Ile Gln His Gly Trp Asp Ala
 145 150 155 160

atc tct ggc atg cct act aat ctc tat ggt cct aat gac aat ttc cac 528
 Ile Ser Gly Met Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Pro Asn Asp Asn Phe His
 165 170 175

ccg gag aat tct cat gtg ctt cct gct ctt atg agg agg ttc cac gag 576
 Pro Glu Asn Ser His Val Leu Pro Ala Leu Met Arg Arg Phe His Glu
 180 185 190

gcg aaa gtg aat gga gcg gag gaa gtt gtg gtg tgg ggt aca ggt agt 624
 Ala Lys Val Asn Gly Ala Glu Glu Val Val Val Trp Gly Thr Gly Ser
 195 200 205

ccg ttg agg gag ttc ttg cat gtt gat gat ttg gct gat gct tgt gtt 672
 Pro Leu Arg Glu Phe Leu His Val Asp Asp Leu Ala Asp Ala Cys Val
 210 215 220

ttc ttg ctg gat cga tac agc ggg ttg gag cat gtt aac att gga agt 720
 Phe Leu Leu Asp Arg Tyr Ser Gly Leu Glu His Val Asn Ile Gly Ser
 225 230 235 240

ggt caa gaa gtg act att aga gag ttg gct gag ttg gtg aaa gag gtt 768
 Gly Gln Glu Val Thr Ile Arg Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Glu Val
 245 250 255

gtt ggt ttt gaa ggg aag ctt gga tgg gat tgc act aag cca gat ggc 816
 Val Gly Phe Glu Gly Lys Leu Gly Trp Asp Cys Thr Lys Pro Asp Gly
 260 265 270

aca ccg agg aaa ctt atg gac agc tca aag ctc gcg tct ttg ggt tgg 864
 Thr Pro Arg Lys Leu Met Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Leu Gly Trp
 275 280 285

aca cct aag gtt tct ctt aga gat ggt ctg agc caa act tat gat tgg 912
 Thr Pro Lys Val Ser Leu Arg Asp Gly Leu Ser Gln Thr Tyr Asp Trp
 290 295 300

tat ttg aag aat gtt tgc aac cga 936
 Tyr Leu Lys Asn Val Cys Asn Arg
 305 310

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

attggtacca tgtctgacaa atctgccaaa atcttcgtc

39

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

ttagtcgacg atatctcggg tgcaaacatt cttcaaatac caatcataag

50

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gtcgaattca tggcgtcaga gaacaac

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

gaactcgaga gggtgctgct tagcatc

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/90, C12N 15/61, C12P 19/02, C12N 1/19 //
(C12N 1/19, C12R 1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/90, C12N 15/61, C12P 19/02, C12N 1/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 99/64618, A1 (DCV, INC.), 16 December, 1999 (16.12.99) (Family: none)	1-9
PY	Bonin, C. P. et al., "A bifunctional epimerase- reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the de novo synthesis of GDP-L-fucose in Arabidopsis", Plant Journal (2000), Vol.21, pp.445-454	1-9
A	BIOSIS No.: 199900035636 & Rizzi Menico et al., "GDP-4 keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/ reductase from Escherichia coli, a key enzyme in the biosynthesis of GDP-L- fucose, displays the structural characteristics of the RED protein homology superfamily", Structure (1998), Vol.6, No.11, pp.1453-1465	1-9
A	BIOSIS No.: 199800390115 & Tonetti M. et al., "Preliminary crystallographic investigations of recombinant GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 May, 2000 (17.05.00)

Date of mailing of the international search report
30 May, 2000 (30.05.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02049

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 9/90, C12N 15/61, C12P 19/02, C12N 1/19 //
(C12N 1/19, C12R 1:865)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 9/90, C12N 15/61, C12P 19/02, C12N 1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 99/64618, A1 (DCV, INC.) ファミリーなし 16. 12月. 1999 (16. 12. 99)	1-9
PY	Bonin, C. P. et al., "A bifunctional epimerase-reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the de novo synthesis of GDP-L-fucose in Arabidopsis", Plant Journal (2000), Vol. 21, p. 445-454	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 05. 00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)